

# マメ科植物の種子貯蔵蛋白質の遺伝的変異

関 口 建 二\*・高 原 美 規\*・山 元 皓 二\*

## Genetic Polymorphism of Seed Storage Proteins in Leguminosae

Kenji SEKIGUCHI, Yoshinori TAKAHARA, Koji YAMAMOTO

Leguminosae is a very large family which consists of more than 700 genera and 17,000 species. Many food, fodder and industrial crops are included in the family, and its ability of nitrogen fixation with root nodules makes it a very important group in agriculture. In order to make a collection of genetic resources for crop improvement, it is necessary to be acquainted with taxonomic relationship among groups to get which should include wild relatives. But chemotaxonomy and / or molecular phylogeny in Leguminosae have been still less developed.

A seed of leguminous plants has rich seed proteins and SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) analysis can segregate each component of proteins with relatively simple steps of procedure. We investigate polymorphism of seed storage proteins in Leguminosae with SDS-PAGE analysis in following three respects; 1) interspecific variation associated with taxonomy, 2) intraspecific polymorphism as genetic markers, 3) difference between crops and their wild relatives. In interspecific analysis, band patterns of some species within the same genus or tribe showed similarity, while those of wide relatives were less similar. Intraspecific polymorphism was searched in *Vigna angularis* var. *nipponensis* and two polymorphic bands were detected. One was three patterns of band shift around 70kD and another was presence or not of a band around 60kD. Six types of band patterns were expected by combination of these two sites and five types were actually observed although no morphological characteristics associated with these types was found. Band patterns of soy bean, *Glycine max* and adzuki bean, *Vigna angularis* var. *angularis* were intrinsically the same as those of wild relatives, *Glycine soja* and *Vigna angularis* var. *nipponensis*, respectively, except for quantitative reduction of major bands in cultivated species.

These observations show the availability of seed storage proteins for chemotaxonomy in Leguminosae.

**Key words:** Seed storage proteins / Polymorphism / SDS-PAGE / Chemotaxonomy / Leguminosae

### 1. 緒 言

マメ科に分類される植物は約700属, 17000種を超えており, その数はキク科およびラン科に匹敵する大分類群である。また, マメ科植物は種子中に油脂・蛋白質を豊富に含み, また単位面積あたりの蛋白質収量も高いため, 穀類に次いで重要な地位を占める食用作物となっている。そのため蛋白質栄養や飼料の蛋白質源として, 今後ますますその重要性は増していくものと考えられている。

マメ科は, 多くの栽培種や遺伝資源として利用可能な野生種を含んでいる。しかし, 品種・系統の遺伝資源としての評価は, 生育特性や外観形質などを基準として行われている場合が依然として多く, 生化学的な特性による評価はまだ少ない。

本研究は, マメ科植物において分子育種を幅広く取り入れていく場合に必要となる形質マーカーや分類指標として, 種子貯蔵蛋白質に存在する遺伝的変異を利用するための基礎的研究である。

種子貯蔵蛋白質とは発芽の際に幼植物の窒素源となるために種子中に多量に蓄積されている蛋白質の総称で, 一般に種や系統に特有の電気泳動パターンを示すことが知られている。そのため, 種子貯蔵蛋白質の電気泳動パターンを種間や品種間などで比較・解析することにより遺伝的な相同性の解明や, それらの類縁関係の判定につながるデータを得ることができる。また, 種子貯蔵蛋白質を支配する遺伝子と実用形質を支配する遺伝子との関係が確認されれば, 種子貯蔵蛋白質を分析することによりその形質に関しては目的形質の発現を待たずして選抜することが可能になると期待される。

本報では, 種子貯蔵蛋白質の電気泳動パターンについて, 1. マメ科植物種間における差異と類縁関係の関連, 2. 同一種内における系統間変異の分析, 3. 栽培種とそれに対する野生種の比較, を調査し得られた知見を報告する。また, 今後に残された問題点を整理し, マメ科植物の種子貯蔵蛋白質の多方面における利用についてこれからの展望を記した。

Table 1 List of Tested Species  
供試種一覧

亜科	族	属	和名	学名
ジャケツイバラ亜科	カワラケツメイ族	カワラケツメイ属	カワラケツメイ	<i>Cassia nomame</i>
ネムノキ亜科	ネムノキ族	ネムノキ属	ネムノキ	<i>Albizia julibrissin</i>
ソラマメ亜科	アエスキノメネ族	ナンキンマメ属	ラッカセイ	<i>Arachis hypogaea</i>
	イタチハギ族	クロバナエンジュ属	イタチハギ	<i>Amorpha fruticosa</i>
	ヌスビトハギ族	ハギ属	メドハギ	<i>Lespedeza cuneata</i>
	イワオウギ族	クサネム属	クサネム	<i>Aeschynomane indica</i>
	インゲンマメ族	ヤブマメ属	ヤブマメ	<i>Amphicarpaesedgeworthii</i>
		ダイズ属	ダイズ	<i>Glycine max</i>
			ツルマメ	<i>Glycine soja</i>
		クズ属	クズ	<i>Pueraria lobata</i>
		インゲンマメ属	インゲンマメ	<i>Phaseolus vulgaris</i>
		ササゲ属	ヤブツルアズキ	<i>Vigna angularis</i>
			ケツルアズキ	<i>Vigna mungo</i>
			リョクトウ	<i>Vigna radiata</i>
	ハリエンジュ族	ハリエンジュ属	ニセアカシア	<i>Robinia pseudacacia</i>
	クララ族	クララ属	クララ	<i>Sophora flavescens</i>
	テフロシア族	フジ属	ノダフジ	<i>Wisteria floribunda</i>
			ヤマフジ	<i>Wisteria brachybotrys</i>
	ソラマメ族	レンリソウ属	スイートピー	<i>Lathyrus odoratus</i>
		エンドウ属	エンドウ	<i>Pisum sativum</i>
		ソラマメ属	ソラマメ	<i>Vicia faba</i>
			クサフジ	<i>Vicia cracca</i>
			カラスエンドウ	<i>Vicia sativa</i>

## 2. 材料と方法

### 2. 1 材料

実験試料には本校周辺の自生種、カワラケツメイ、ネムノキ、イタチハギ、メドハギ、クサネム、ヤブマメ、ツルマメ、クズ、ヤブツルアズキ、ケツルアズキ、ニセアカシア、クララ、ノダフジ、ヤマフジ、クサフジ、カラスノエンドウの16種、関連した栽培種ラッカセイ、ダイズ、インゲンマメ、アズキ、リョクトウ、スイートピー、エンドウ、ソラマメの8種を加えた24種の種子を収集した。これらの種について形態の比較から従来示されている系統分類を亜科、族の上位分類に従い表-1に示した<sup>1,2)</sup>。ただし、野生種のヤブツルアズキと栽培種のアズキは同種とされ同一の学名が付けられているので、表-1には23種が示してある。自生種は、群落別または個体別に採種し、栽培種は長岡市内の園芸店から購入した。収集した種子サンプルから電気泳動用試料を作成し、SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) 解析に供試した。

### 2. 2 種子貯蔵蛋白質の抽出と電気泳動用試料の調整

種子の種皮に穿孔後、蒸留水に浸漬し低温下 (～4

℃) で12時間程度吸水させた。SDSを0.4%含むpH 6.8の0.5M Tris-HCl緩衝液を抽出用バッファとし、吸水させた種子から摘出した子葉0.05～0.1gに抽出用バッファを400μl加えて乳鉢で摩砕した。摩砕液をチューブにマイクロピペットで移し、4℃・14000gで15分遠心した。上清を新しいチューブに移し、蒸留水を200μl～(総量約600μl)、SDS10%溶液100μl、グリセリン200μl、2-メルカプトエタノール10μlを加えた。それらをよく混合し90℃の水浴で2分の熱処理後、冷蔵保存したものを泳動用試料とした。なお、変性処理までの作業は低温下で行い、マイクロテストチューブ、ピペットチップはオートクレーブ滅菌したものを用いた。

### 2. 3 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

抽出したサンプルはLaemmli (1970) の方法<sup>3)</sup> によるSDS-PAGEを行った。電気泳動装置はATTO株式会社製AE-6200型スラブゲル電気泳動装置、電源制御装置は同AE-8400型を用いた。濃縮ゲルはpH 6.8ゲル濃度4.5%、分離ゲルはpH8.8ゲル濃度10%に設定し、定電流30mAでおおよそ150分泳動した。

泳動後、クマジーブリリアントブルー染色液中に2～4時間浸漬・震盪させて染色し、その後脱色液中に

3～12時間浸漬・震盪させて脱色した。脱色の終了したゲルは蒸留水による洗浄，不要部分の切除の後，乾燥機を使用して2時間程度乾燥させた。

#### 2. 4 種間差異と類縁関係

表-1に示した各種を供試試料として種子貯蔵蛋白質の電気泳動を行い，その泳動パターンを調べそれぞれの分類群における特徴や傾向を調べた。

#### 2. 5 同一種内（ヤブツルアズキ）における変異

本学敷地内14地点，砂利採取場（中越興業深沢工場）隣接農耕放棄地11地点，田宮病院周辺1地点，信濃川河川敷越路橋周辺3地点，千秋が原近代美術館周辺2地点の計31地点で採種されたヤブツルアズキを材料とし，種内変異の有無，地理的分布，外部形態との関連について調べた。

#### 2. 6 栽培種と野生種の比較

供試試料はアズキ（cv.大納言）とダイズ（cv.十五夜香枝豆），またそれらの祖先種あるいは近縁野生種と考えられているヤブツルアズキとツルマメを用いた。種子の吸水後摩砕する子葉の重量を0.04gに，また泳動用試料作製時に加える薬品類や泳動にかかる試料の量など，泳動用試料の蛋白質濃度に影響を与える要素を全て統一して実験を行い，泳動パターンと蛋白質量について栽培種と近縁野生種との比較を行った。

### 3. 結 果

#### 3. 1 種間差異と類縁関係

得られた種子貯蔵蛋白質の電気泳動像を図-1に示す。この泳動像には多くのバンドが現われたが，比較的量の多い種子貯蔵蛋白質に着目すると，以下の3つのグループが認識できた。

90kDと50kD付近の2ヶ所に分布するグループ

ヤブマメ・ダイズ・ツルマメ・クズ。

50kD周辺に限られるグループ

インゲンマメ・アズキ・ヤブツルアズキ・ケツルアズキ・リュクトウ

70～35kDの範囲に4つの太いバンドが現われるグループ

スイートピー・エンドウ・ソラマメ・クサフジ・カラスノエンドウ

その他の種間には，ノダフジとヤマフジの泳動像がよく一致することを除けば，明確な関係は見られなかった。

この分類を収集したマメ科植物を属別に分類した表-1と比較すると，それぞれのグループは族や属の分類とよく一致している。さらに100kD付近のバンドの差異など，量の少ない蛋白質から得られる知見も総合すると，同属の種間の泳動像は他属の種の泳動像と比べると相関が高く，また同族の属間には他族のものよりも近いことが確認された。

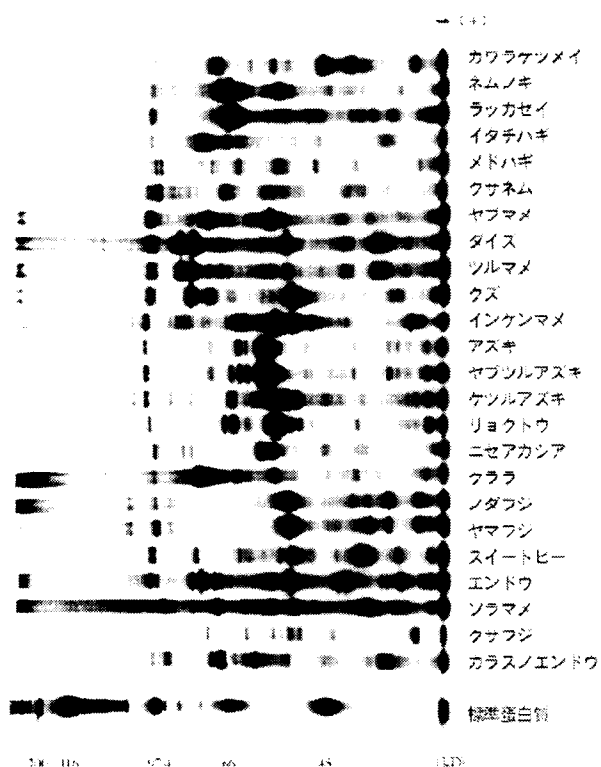
各亜科間・族間の遺伝的距離については判断ができなかった。

#### 3. 2 同一種内（ヤブツルアズキ）における変異

技大構内と長岡市内の自生地からの種子を材料に，種内における種子貯蔵蛋白質の変異を観察するために行った。これらの種子採集地はいずれも未利用地であった。これらの種子の電気泳動像からは，70kD付近のバンドの高・低分子側双方への移動という変異と60kD付近のバンドの有無という変異が観察された（図-2A）。この2点の変異を組み合わせから，採集したヤブツルアズキを6タイプに分類することができるが（図-2B），タイプ3は今回収集した種子中には存在しなかった。これらの変異の存在からヤブツルアズキの地理的分布との関連を探索したところ（表-2），得られた知見は60kD付近のバンドを欠いている個体が本校周辺にのみ分布しているということだけであっ

Table 2 Regional Distribution of Intraspecific Polymorphism in *Vigna angularis* var. *nipponensis*  
ヤブツルアズキ種内多型の地理的分布

	タイプ						総数
	1	2	3	4	5	6	
本学敷地内	10	2		2			14
砂利採取場中越興業深沢工場隣接地	4			5	1	1	11
田宮病院周辺				1			1
信濃川河川敷越路橋周辺				1	1	1	3
千秋が原近代美術館周辺				1	1		2
総数	14	2	0	10	3	2	31



マメ科植物種子貯蔵蛋白質のSDS-PAGE分析  
Fig. 1 SDS-PAGE Analysis of Storage Proteins in Leguminous Species

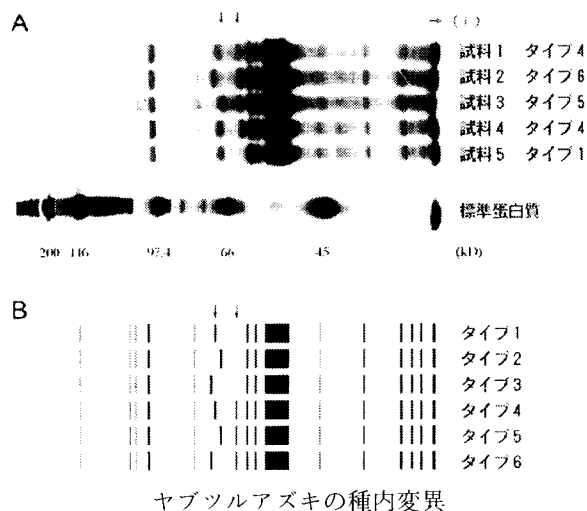


Fig. 2 Intraspecific Divergence in *Vigna angularis* var. *nipponensis*  
A: SDS-PAGE Patterns  
B: Definition of Six Types

た。しかし本校周辺には60kD付近のバンドの現われる個体も存在しており、地理的分布と種子貯蔵蛋白質との直接の関連は認められなかった。

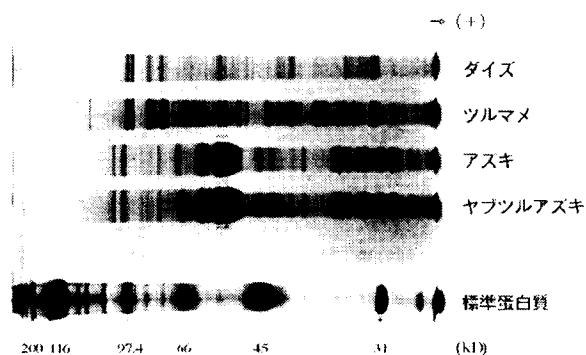
種子を採取した植物には、植物体の色で2形態の、種皮色で5形態の多型が観察された。植物体の色に関

しては、茎や葉柄が紫色を呈する個体を通常型とし、紫色が現れない個体を淡色型とした。種子のほとんどは黒色にやや模様の入った種皮色で、これを通常型とした。植物体の色が通常型のは全て通常型の種子を着けた。淡色型の植物体の種子には、アズキ色のもの、褐色のもの、緑色のもの、褐色と緑色の中間的なものという4つの多型が見られた。しかし、電気泳動パターンによる6タイプの分類と、外観形質による分類は一致しなかった。また、淡色型個体の種子を栽培し次代の種子を得て、その種子色と種子貯蔵蛋白質の電気泳動パターンを親子間で比較したところ、種子色では親子間でかならずしも一致しなかったのに対し、電気泳動像は完全に一致した（データ省略）。

### 3. 3 栽培種と野生種の比較

電気泳動像を図-3に示す。栽培種とその祖先種・野生種の種子貯蔵蛋白質の比較については、アズキとヤブツルアズキの間で70kD付近のバンドに差異が観察された。このバンドはヤブツルアズキの変異バンドのひとつであり、また、図-1でのアズキとヤブツルアズキの種子貯蔵蛋白質の泳動像の差異は60kD付近のバンドの有無のみで、ヤブツルアズキの種内で見られた変異しか認められなかった。ダイズとツルマメの間では泳動像の差異は観察されなかった。

次に各バンドの濃度に注目して泳動像を観察したところ、発現・蓄積量の少ない蛋白質のバンドには顕著な濃度変化が観察されなかった。それに対して、アズキでは50kD付近、ダイズでは70~90kD付近の主要な種子貯蔵蛋白質のバンドで濃度の明確な低下傾向が栽培種において認められた。



栽培種と野生種の比較  
Fig. 3 Comparison between Cultivated Species and Wild Relatives

#### 4. 考 察

マメ科植物は分類群ごとに特異な物質を多く含んでおり、現在、それらを使つての化学分類学的研究が多方面で進められている<sup>4-7)</sup>。また遺伝子を直接解析する、RFLPやRAPD分析も試みられている<sup>8-12)</sup>。一方、種子貯蔵蛋白質はどのマメ科植物の種子にも豊富に含まれており、広範囲の種を簡便かつ標準化した方法で調査することができる。種子貯蔵蛋白質の解析はマメ科植物の生化学的分類の一手法として欠かせないものであると考える。

マメ科植物の種子貯蔵蛋白質の大部分は子葉中の蛋白質顆粒内に存在している。例えばダイズにおいてはそのおよそ90%が水で抽出され、さらにそのうちの約90%はグロブリンで占められる。本来グロブリンは塩可溶性蛋白質であり、水には不溶であるはずだが、子葉中に含まれる塩類のために水抽出が可能であると考えられている。グロブリンは7Sグロブリンと11Sグロブリンに大別されるが、これらの蛋白質は電気的性質が良く似ていること、サブユニットで構成される大きな分子であること、pHやイオン強度の変化によって複雑な解離会合反応を起こすことが報告されている<sup>13)</sup>。従つて電気泳動による分離は容易ではないが、遺伝的変異を探索するためにはそれらをできるだけ個々に認識し得る、分離能の高い手法が望ましい。また遺伝的変異を解析するときには多数の試料を扱うため、簡便で再現性が良いことも要求される。本研究では、吸水させた子葉をSDSを含む抽出バッファー中で摩砕し、遠心した上清にメルカプトエタノールを加えて熱変性させたものを泳動用試料とすることで、分離能が高くまた再現性の良い泳動像を得ることができた。

本研究はマメ科植物の種子貯蔵蛋白質について、分子生物学的育種を幅広く取り入れていく場合に必要となる形質マーカーや分類指標としての利用を想定して行われた基礎的研究である。以下の3点の結論が得られた。

- 1: 種間の比較において種子貯蔵蛋白質は、既存の分類群、類縁関係によく一致した。
- 2: 同一種内における変異・多型は、外観形質、あるいは地理的分布との関連について確証が得られなかった。
- 3: 栽培種とその祖先種・野生種の種子貯蔵蛋白質の比較では、主要な種子貯蔵蛋白質で濃度の低下傾向が栽培種において観察された。

以上より、マメ科植物の種・系統分類のための生化学的判断要素のひとつとして、種子貯蔵蛋白質は利用

が可能であり、十分に価値を有していると判断した。

本研究で想定しているマメ科植物の生化学的分類指標は、環境要因に影響を受けやすい外観形質や生育特性を調査することなく、分類の不明確な植物種を簡便な検定で既存の分類群に当てはめるために使用されるものである。この場合、分類指標の候補となる形質に求められる特性は、既存の分類群で考慮されている類縁関係との相関である。この実験では近縁度が高いとされている属間、あるいは近縁度が高いとされている種間における種子貯蔵蛋白質の電気泳動像の近似が示された。それは換言すれば、マメ科植物種の近縁度とその種子貯蔵蛋白質の類似性には相関関係が存在するということであり、想定した分類指標としての特性を満たしている。

蛋白質の異同や多型に関する分析は遺伝子組成の相同性を解明し、類縁関係を推定するうえで非常に有効な手段である。この実験で明らかにしたマメ科植物の種子貯蔵蛋白質の既存の種間類縁度との相関は、マメ科植物の分類学的研究における種子貯蔵蛋白質解析の重要性を示している。しかし一方で、遠縁間の比較ではバンド同士の対応関係も分からず、遠縁であることしか分からない。特異抗体を用いて免疫染色を行えば、バンド間の対応関係は分かるが簡便性は損なわれてしまうという限界はある。いずれにせよ、系統分類は、形態学的、生化学的な様々な指標から総合して判断する必要がある、種子貯蔵蛋白質はその中で重要な位置を占めると考えられる。

種内に、種子貯蔵蛋白質の多型や異同が観察されれば、各種の遺伝的マーカー同様に種内の系統関係の指標として用いることができる。また、種子貯蔵蛋白質自体が特定の形質の反映ではなくても、特定の形質と強連鎖したバンドがあれば、その形質の発現を待たずに、泳動パターンを指標に選抜が行える。ヤブツルアズキの種子貯蔵蛋白質の変異を特定形質の遺伝マーカーに利用するという試みは、現時点では可能性があるという程度にしか判断できない。

人口爆発による蛋白食料と、化石燃料の資源枯渇の時代に向かいつつある現在、化学的固定窒素使用量の約3倍に相当する年間1.5~1.75億トンの共生固定窒素を全世界の耕地に供給しているマメ科植物の食料、作物としての重要性はますます高まっている。そうした期待に応えるため有用なマメ科植物の探索・開発は多くの研究機関で行われている。なかでも野生種には栽培種にはみられない多くの有用形質が存在していると考えられる。本研究を継続・発展させ、変異種・株の探索と共に、変異した蛋白質そのものの分析も行え

ば、種子貯蔵蛋白質の解析からそうした形質の一端を捉え、栽培種への導入を種子貯蔵蛋白質を指標として試みることも可能となるだろう。

## 5. ま と め

本研究では、マメ科植物の種子貯蔵蛋白質を抽出し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動することで、その電気泳動パターンに種内および種間の変異が確認できた。

種間においては、従来の形態学的分類群に対応してグループごとに、量的に多い蛋白質の分子量分布に違いが見られた。近縁のものほど近似したバンドパターンを示し、系統分類の指標として利用できることが示唆された。種内においては、種特有の主要なバンドのパターンは変化なく、比較的量の少ないいくつかのバンドで多型が見られたが、形態的形質および地理的分布との関連は認められなかった。栽培種とその祖先種・野生種の種子貯蔵蛋白質の比較では、バンドパターンは種内変異の範囲内だが、主要な種子貯蔵蛋白質で濃度の低下傾向が栽培種において観察された。

以上より、マメ科植物の種・系統分類のための生化学的判断要素のひとつとして、種子貯蔵蛋白質は利用

が可能である。今後、野生種を遺伝資源として活用する上で、種子貯蔵蛋白質の解析から有用形質の一端を捉え、またこれを指標として栽培種への導入を試みることも可能となるだろう。

## 参考文献

- 1) 北村四郎, 村田源, 原色日本植物図鑑草本編(II) 離弁花類, p.91-120, 保育社, 1990.
- 2) 秋山忍, 大場秀章, 園芸植物大事典 2, p.2316-2322, 小学館, 1994.
- 3) Laemmli, U. K., Nature, 227, P.680-685, 1970.
- 4) 石本政男, 化学と生物, 32(3), 169-173, 1994.
- 5) 竹谷勝, 江川宜伸, 奥野員敏, 育種, 42(別2), 576-577, 1992.
- 6) 山口裕文, 小菅桂子, 育種, 41(別2), 164-165, 1991.
- 7) 平田聡之, 由田宏一, 島本義也, 中島博, 育種, 47(別1), 128, 1997.
- 8) 福士泰史, 山本門, 大原雅, 阿部純, 島本義也, 育種, 45(別1), 245, 1995.
- 9) 高忠, 阿部純, 島本義也, 育種, 47(別1), 137, 1997.
- 10) 内藤嘉磯, 丹羽勝, 平山敏枝, 田部井豊, 育種, 47(別1), 61, 1997.
- 11) 友岡憲彦, V. A. Sumanasinghe, 加賀秋人, 江川宜伸, 育種, 45(別1), 181, 1995.
- 12) 外塚亜寿美, 福士泰史, 金澤章, 阿部純, 島本義也, 育種, 47(別1), 136, 1997.
- 13) 原田久也, 博士論文, 東京大学, 1997.